



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
“GENOSENSORES Y SU APLICACIÓN EN
EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS”

Autor: Cristina Santa García-Lorezana

D.N.I.: 50756926-C

Tutor: Beatriz López Ruiz

Convocatoria: Junio 2015

CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	8
Vibrio cholerae	12
Virus del dengue	13
Salmonella spp	14
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	16
REFERENCIAS	17

RESUMEN

Las enfermedades alimentarias constituyen un importante problema de salud pública y, además, tienen graves repercusiones en la economía de los países. Es necesario por tanto implantar métodos de fácil aplicación e interpretación para la detección de los patógenos que las causan. El objetivo del presente trabajo es revisar información para conocer el diseño, funcionamiento y aplicabilidad de los genosensores como método de análisis electroquímico en patógenos presentes en alimentos, y con ello compararlo frente a técnicas clásicas de análisis. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica a través de tres bases de datos diferentes revisando artículos publicados en los últimos 15 años. Se concluyó que los genosensores se tratan de dispositivos de análisis baratos, selectivos y de fácil manejo que utilizan el material genético de virus y bacterias para su detección mediante una reacción de hibridación. La irrupción de estos dispositivos ha supuesto una revolución en el análisis de alimentos, detectando la presencia de patógenos responsables de enfermedades como el cólera, el dengue o la salmonelosis, entre otras. Su efectividad, rapidez y fácil manejo hacen que estos dispositivos sean una buena alternativa a los métodos clásicos como el cultivo celular, donde el aislamiento e identificación es un proceso largo de varios días de duración o la PCR a tiempo real, que requiere de laboratorios con instrumentación compleja y personal especializado para su desarrollo.

ABSTRACT

Food-borne diseases are a major public health problem which have serious repercussions on the economy of the countries. It is necessary to establish easy-to-implement application and interpretation methods for the detection of the pathogens that cause these diseases. The aim of this study is to review all the information needed to understand the design, mechanism and effectiveness of genosensors as a method of electrochemical analysis in food pathogens, and compare them against traditional techniques. To achieve this, a literature search was performed using three different databases and reviewing articles published in the last 15 years. It was concluded that genosensors are cheap, selective and easy-handling devices that use the genetic material of virus and bacteria for its detection by a hybridization reaction. The emergence of these devices has supposed a revolution in food analysis, detecting the presence of

pathogens responsible of diseases such as cholera, dengue and salmonella, among others. Their effectiveness, speed and simplicity make them a good alternative to traditional methods such as cell culture, in which isolation and identification is a long process that requires several days or real-time PCR, which involves complex instrumentation laboratories and specialized staff for its development.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Según la Organización Mundial de la Salud¹, las enfermedades transmitidas por alimentos se definen como «El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (p. ej., bacterias o parásitos) o no biológicos (p. ej., plaguicidas, metales pesados o alérgenos) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas»².

La presencia de contaminaciones alimentarias, ya sean intoxicaciones o infecciones bacterianas o parasitarias, o una combinación de las mismas (infecto-intoxicación), es muy frecuente y afectan sobre todo a grupos sociales de bajos recursos. Estos últimos, por razones económicas, la mayoría de las veces sólo tienen acceso a alimentos de bajo costo y, por ende, de calidad e inocuidad que en muchos casos es por lo menos dudosa.

En los últimos años, ha habido numerosas publicaciones acerca de brotes de graves de enfermedades transmitidas por alimentos que han subrayado la importancia de controlar las materias primas y los productos de la comida preparada para detectar la presencia de bacterias patogénicas en tiempo real.³

Es necesario, por lo tanto, implementar soluciones prácticas que permitan a los productores, procesadores y distribuidores de alimentos, utilizar métodos prácticos de fácil interpretación y aplicación, ya sea para prevenir o para corregir las principales causas que dan origen a la presencia de enfermedades transmitidas por los alimentos.

Los métodos basados en cultivos celulares fueron los primeros en utilizarse en el análisis de alimentos y aún persisten en muchos laboratorios. Involucran un estudio morfológico del organismo además de comprobar su habilidad para crecer. Estos métodos son altamente específicos y moderadamente sensibles; sin embargo, las

exigencias nutricionales de la bacteria (necesita medios de cultivo especiales) y los largos períodos de incubación necesarios para su crecimiento hacen que su aislamiento e identificación sea un proceso verdaderamente tedioso (hasta diez días para obtener resultados definitivos). Además, la presencia de microorganismos que inhiben su multiplicación condiciona la sensibilidad y eficacia del método. Por todo ello, su aplicación clínica es limitada.⁴

La forma más rápida e inequívoca de identificar un patógeno es a través de su material genético (ADN, r-ARN, m-ARN) y éste es el fundamento de las metodologías que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Debido a la baja abundancia de la bacteria en las muestras clínicas, se lleva a cabo una amplificación de la secuencia de ácido nucleico específica y, en función del tipo de matriz biológica, se puede obtener una sensibilidad y selectividad igual o incluso mejor a las proporcionadas por las pruebas microbiológicas convencionales y con una reducción significativa del tiempo de análisis⁵⁶. Sin embargo, hay casos en los que se requiere una modalidad más avanzada, la PCR a tiempo real, que permite no sólo la identificación sino también la cuantificación del organismo⁷. Con esta técnica se pueden obtener resultados 24-48 horas después de la llegada de la muestra. Esto la convierte en un método particularmente útil para el control de focos potenciales de contaminación ya que, en un período de tiempo en el que los resultados del cultivo aún no estarían disponibles, es posible iniciar las acciones correctoras oportunas. Sin embargo requieren de laboratorios con instrumentación compleja y personal especializado para su desarrollo, sin mencionar el riesgo de degradación de la muestra durante su transporte al centro de análisis. Por ello existe una clara demanda de ensayos rápidos para medidas de campo que facilitarían el control de la bacteria en las instalaciones permitiendo la inmediata adopción de medidas correctivas para evitar que la bacteria llegue a infectar al hombre.

Una buena alternativa es el desarrollo de sensores electroquímicos para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Estos dispositivos están ganando importancia gracias a su sensibilidad, rapidez y posibilidad de construcción de sensores desechables de bajo coste; además de su potencial para la miniaturización y automatización. Por todo ello, los genosensores electroquímicos son especialmente adecuados para realizar análisis de campo.⁸

El ADN es el material genético de todos los seres vivos. La estructura del ADN proporciona las bases químicas para almacenar y expresar la información genética en las células, así como para transmitirla a las generaciones futuras. Los ácidos nucleicos juegan un papel cada vez más importante en el desarrollo de métodos de análisis.

Los sensores de ADN o genosensores utilizan la reacción de hibridación como reacción de reconocimiento molecular para la detección sensible y selectiva de secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas. Estas secuencias generalmente se amplifican previamente por PCR. Se denomina hibridación al proceso por el cual dos hebras de ácidos nucleicos se unen por reconocimiento de la complementariedad de sus bases, para formar una doble hélice estabilizada por puentes de hidrógeno cooperativos. Es un proceso de reconocimiento muy selectivo que involucra dos etapas. Se inicia con la nucleación, que corresponde al contacto entre dos secuencias complementarias de pequeña longitud, y continúa con el enlace rápido de los restantes pares de bases para formar la doble hélice.

La reacción de hibridación presenta dos características fundamentales: por un lado la especificidad, que justifica su enorme potencial analítico ya que la unión viene determinada por el reconocimiento de la secuencia de bases; y por el otro la reversibilidad, proporcionada por las interacciones no covalentes entre ambas hebras.

Los genosensores son por tanto dispositivos que utilizan como elemento de reconocimiento secuencias de ácidos nucleicos (sonda) inmovilizadas sobre la superficie de un transductor. La interacción sonda-analito (Figura 1), dará lugar a un cambio en la superficie sensora que generará una señal en el transductor relacionada con la concentración de analito.⁹

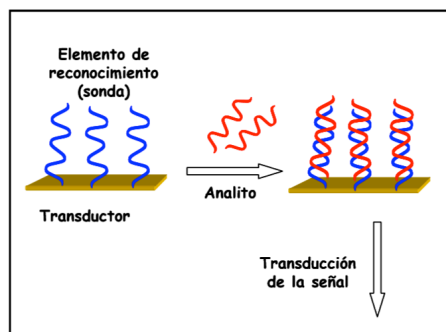


Figura 1: Esquema de funcionamiento de un sensor de ADN

A través de la búsqueda bibliográfica se puede obtener un mejor conocimiento del impacto y funcionamiento de estos dispositivos. Es importante aunar toda la información necesaria para conocer su mecanismo de acción y determinar su eficacia para poder establecer criterios que los diferencien de otros métodos de análisis

OBJETIVOS.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica a través de diversas bases de datos científicas con el fin de evaluar el diseño, funcionamiento y aplicabilidad de estos dispositivos y con ello confirmar su relevancia frente a métodos ya establecidos, como el cultivo celular o la PCR a tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

La búsqueda literaria se realizó usándose tres bases de datos de literatura médica: PubMed/MEDLINE, SCOPUS, y el Catálogo Cisne de la Universidad Complutense de Madrid. En los criterios de búsqueda se utilizaron palabras clave como “genosensores”, “electroquímicos”, “alimentos” o “análisis” y sus correspondientes traducciones al inglés: “genosensors”, “electrochemical”, “food”, “analysis”. A su vez, se comprobó la bibliografía de los artículos revisados con el fin de localizar estudios adicionales no identificados en la primera exploración. El rastreo de información se limitó a artículos en español o inglés que fueran publicados en los últimos 15 años.

Se encontraron una gran cantidad de artículos, de los cuales 12 se estudiaron en profundidad. Tres de estos se utilizaron como referencia para demostrar la aplicabilidad de estos dispositivos. Las razones de descartar algunos artículos fueron bien por tener objetivos que diferían con los criterios de la búsqueda, o por no tener resultados concluyentes. Las referencias de los artículos considerados relevantes se encuentran especificadas en el trabajo.

RESULTADOS

La búsqueda de información llevó a tener en consideración tres aspectos importantes de los genosensores: su diseño, su funcionamiento y su aplicabilidad. Esta última se comprobó a través de tres estudios enfocados al análisis de patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos.

Dos etapas básicas en el **diseño** de un genosensor son la selección de la sonda (ácido nucleico utilizado para reconocer selectivamente una secuencia diana o analito) y la inmovilización de esta sobre el transductor seleccionado.

Desde su inicio se ha usado como sonda la cadena complementaria al ADN o ARN purificado del organismo. En los últimos tiempos, con la finalidad de mejorar las características analíticas en los ensayos fundamentados en la reacción de hibridación, se han buscado compuestos alternativos entre los que destacan los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), ácidos nucleicos bloqueados o LNAs o dendrímeros de ADN.

El buen funcionamiento de un genosensor depende, en gran medida, de la inmovilización de la sonda sobre el transductor. Es necesario favorecer un íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor, manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad del sistema de reconocimiento.¹⁰ Los mecanismos más importantes son:

- Adsorción: es el método más simple de inmovilización, debido a que no requiere reactivos especiales ni utilización de DNA funcionalizado. Este método presenta desventajas, ya que existe la posibilidad de desorción del DNA de la superficie del transductor, y también las pobres eficiencias de hibridación, ya que la adsorción ocurre en múltiples sitios de la cadena de DNA confiriendo menor flexibilidad a la hebra de ácido nucleico limitando su capacidad para interaccionar en las condiciones de operación.
- Inmovilización por complejación: la avidina y estreptavidina son grandes proteínas tetraméricas que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La biotina es una molécula pequeña (vitamina) que se une con gran afinidad a la estreptavidina, con una constante de afinidad cercana a la de unión covalente. Debido a su fuerte interacción, la formación del complejo casi no se ve afectada ni por el pH, ni por temperaturas extremas, ni por disolventes orgánicos ni por

agentes desnaturalizantes.¹¹ Una modalidad de este tipo de inmovilización son los ácidos nucleicos modificados con biotina, que se inmovilizan sobre la superficie electródica funcionalizada con avidina.

- Inmovilización por unión covalente: estas técnicas son las más estables y las que poseen mayor eficiencia de hibridación. Se busca obtener superficies modificadas de forma permanente. Para llevarla a cabo es necesario introducir grupos funcionales en la superficie electródica y en los ácidos nucleicos de forma adecuada. Los ácidos nucleicos se modifican preferentemente en uno de los extremos de la cadena añadiéndoles espaciadores con grupos funcionales. De este modo se puede controlar mejor la orientación de las moléculas inmovilizadas.¹²

Una vez inmovilizada la sonda se produce la **transducción electroquímica**. La señal que se produce tras el reconocimiento molecular se puede generar de manera directa o indirecta, bien utilizando sondas marcadas con moléculas que poseen actividad redox (marcadores electroactivos) o enzimas cuyos productos de reacción son electroactivos.¹³

Una manera de generar una señal directa es mediante la utilización de sondas de captura estructuradas (horquillas de ADN) funcionalizadas con una molécula electroactiva. Para ello se diseña una sonda con estructura mango-bucle (Figura 2), inmovilizada sobre el electrodo en un extremo y funcionalizada con una molécula electroactiva en el otro extremo. La hibridación con la secuencia diana complementaria provoca la apertura de la horquilla acompañada de una disminución de la señal redox al producirse un aumento de la distancia entre el marcador electroactivo y la superficie electródica.

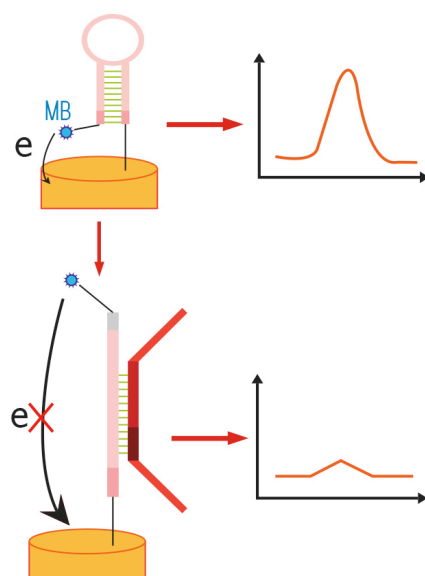


Figura 2: apertura de la sonda de captura estructurada, mango-bucle, modificada con azul de metileno provocando una disminución en la señal

En los métodos indirectos que emplean enzimas, estas pueden estar unidas a la cadena directamente (de manera covalente) o indirectamente a través de enlaces de afinidad biotina-estreptavidina o fluoresceína-Ac anti fluoresceína. Para el ensayo “tipo sandwich” se utilizan estas últimas. En este tipo de hibridación se diseña una sonda de captura que solo sea complementaria a una parte de la secuencia diana, y una segunda sonda indicadora complementaria a otra parte de ésta (Figura 3). Dado que hay dos reacciones de reconocimiento, este tipo de ensayos aumentan la selectividad de la selección.¹⁴

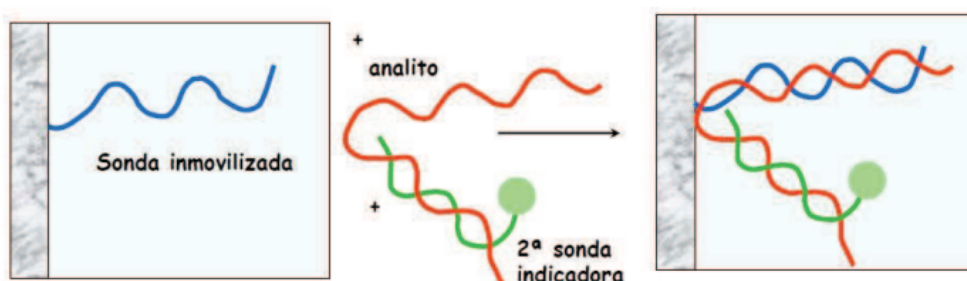


Figura 3: Esquema de un ensayo de hibridación tipo sandwich

En el siguiente cuadro se muestran los diferentes enlaces de afinidad que provocan la señal de manera indirecta

Sonda de ADN funcionalizada con:	Receptor específico:	Marcado con:
Biotina	Avidina o Estreptavidina	Fosfatasa alcalina Peroxidasa
Digoxigenina	Ac antidigoxigenina	Fosfatasa alcalina Peroxidasa
Fluoresceína	Ac anti fluoresceína	Peroxidasa

La señal analítica generalmente se obtiene midiendo la corriente de oxidación o reducción de algún componente de la reacción enzimática, aunque es posible utilizar otras reacciones acopladas.¹⁵(Figura 4)

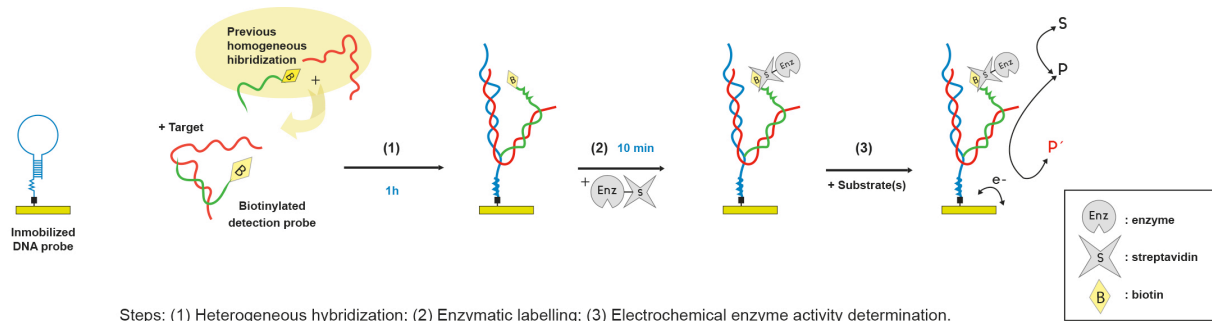


Figura 4: Esquema del reconocimiento y detección electroquímica de secuencias específicas de DNA. La fosfatasa alcalina cataliza la conversión de un compuesto electroquímicamente inactivo en otro electroquímicamente activo cuyo pico de oxidación es usado como señal del genosensor.

En los tres trabajos siguientes se estudia la **aplicabilidad** de los genosensores en la detección de tres microorganismos: *Vibrio cholerae*, virus del dengue y *Salmonella spp*

Vibrio cholerae

Para la detección de esta bacteria responsable del cólera y residente en agua o comida contaminada, se desarrolló un genosensor enzimático con peroxidasa de rábano (HRP), seleccionando como diana la secuencia genética *lolB*. El transductor consistía en un electrodo de carbón serigrafiado (C-SPE) elaborado en el mismo laboratorio donde se realizó la investigación.¹⁶

Se recurrió al uso de sondas de DNA en el genosensor electroquímico para la hibridación específica con DNA monocatenario diana. Se realizó una hibridación doble tipo sándwich utilizando dos sondas específicas de DNA monocatenario diana amplificado por PCR. Esta resultó ser una estrategia efectiva gracias a su capacidad para discriminar entre la secuencia diana de DNA monocatenario y la secuencia de DNA amplificada no específica.

Para ello se inmovilizó la estreptavidina en el electrodo. Después se incorporó la sonda de captura funcionalizada con biotina [VHMR(B)] formándose el complejo biotina-estreptavidina. Seguidamente se añadió el amplicón diana junto con la sonda indicadora funcionalizada con digoxigenina [VHA-AS5(3-D)]. La secuencia diana quedó flanqueada por ambas sondas formándose el “sándwich”. Este proceso se detectó usando anti-DIG-HRP (peroxidasa de rábano unida a anticuerpo anti-digoxigenina) como marcador electroquímico, que cataliza la oxidación de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) con la reducción de H₂O₂, dando un producto de TMB electroquímicamente activo. Se realizó una detección voltamperométrica basada en la medida de la corriente de reducción, en el C-SPE, del TMB previamente oxidado.

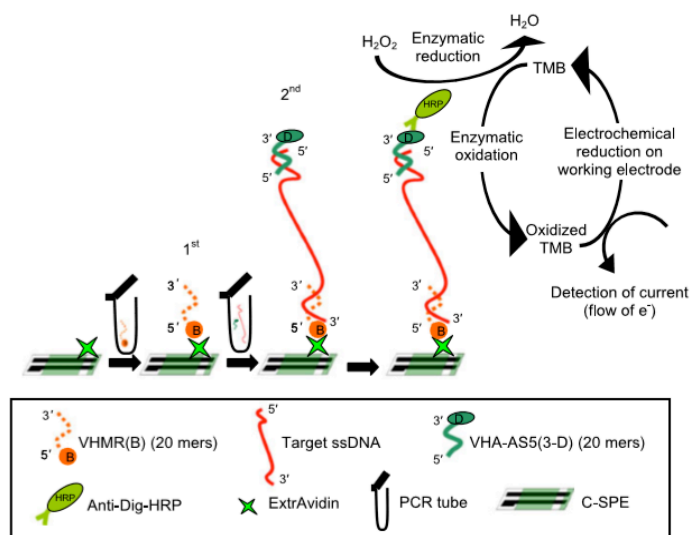


Figura 5: Diagrama de un genosensor electroquímico enzimático con una hibridación tipo sándwich en dos pasos sobre un electrodo de carbón serigrafiado (C-SPE).

Virus del dengue

El virus del dengue es un arbovirus compuesto por RNA monocatenario. Para su detección existen diferentes métodos entre los que se encuentran su aislamiento en cultivo celular, PCR, pruebas serológicas o biosensores.

Utilizar como analito el genoma del virus en lugar de partículas del mismo, antígenos o inmunoglobulinas, cuenta con ventajas y desventajas. La principal ventaja es que posibilita discriminar entre los diferentes serotipos del virus, aunque se requiere de un alto grado de conocimiento en aislamiento de ácidos nucleicos. Debe tenerse en cuenta la inestabilidad de los ácidos nucleicos virales, así como que su detección solo es posible en la fase de viremia.¹⁷

Para la detección genómica de este virus se optimizó la PCR usando electroluminiscencia y amplificación liposomal.

Se propuso su detección mediante hibridación de ARN y detección de fluorescencia. Para este ensayo, se inmovilizó la sonda de captura a unas partículas magnéticas mientras que la sonda indicadora fue funcionalizada con liposomas con un marcador fluorescente en su interior. Si la secuencia diana es complementaria a las sondas, se unirá a la sonda de captura por una parte y a la sonda indicadora por otra.

Una vez formado el “sándwich” se detectará por los liposomas intactos con colorante fluorescente encapsulado, añadiendo disolución detergente (OG), que romperá el liposoma y el marcador fluorescente liberado se medirá mediante microscopía de fluorescencia. (Figura 6)

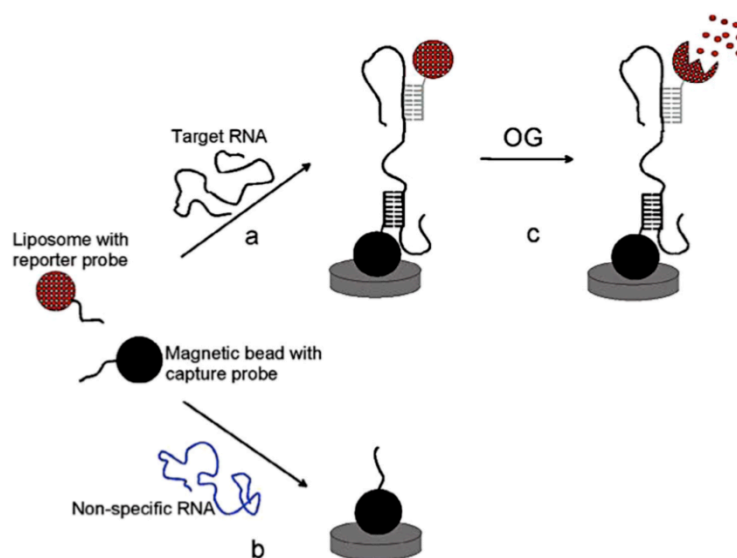


Figura 6: Sistemas de detección usados en el genosensor. (a) Cuando una secuencia específica del virus es presentada, se forma un sándwich entre la sonda indicadora, el RNA y la sonda de captura. Los complejos específicos son detectados a través de liposomas intactos con colorante fluorescente encapsulado a través de microscopía de fluorescencia. (b) No se detecta señal en presencia de RNA no específico. (c) Al añadir disolución de detergente en presencia de secuencias específicas de RNA, los liposomas liberan las moléculas fluorescentes, y la señal es detectada en el momento.

Salmonella spp

Salmonella es una de las causas más comunes de las enfermedades transmitidas por alimentos. La *salmonella* se encuentra en las aves crudas, los huevos, la carne vacuna y, algunas veces, en las frutas y vegetales sin lavar.

Se realizó un estudio en el que se utilizaron electrodos de carbón serigrafiados (C-SPE) para la detección de sus secuencias de ADN específicas.¹⁸

Para la inmovilización de la sonda sobre la superficie del electrodo se utilizó el método de adsorción. Las secuencias complementarias fueron capturadas en la interfaz

del sensor por hibridación mediante un ensayo tipo sándwich con la sonda inmovilizada y una segunda sonda de señalización biotinilada.

Al híbrido biotinilado resultante se le añadió, primero un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina y posteriormente una disolución de α -naftol fosfato. Se usó voltametría de pulso diferencial para detectar la corriente de oxidación generada por el α -naftol producido enzimáticamente. (Figura 6)

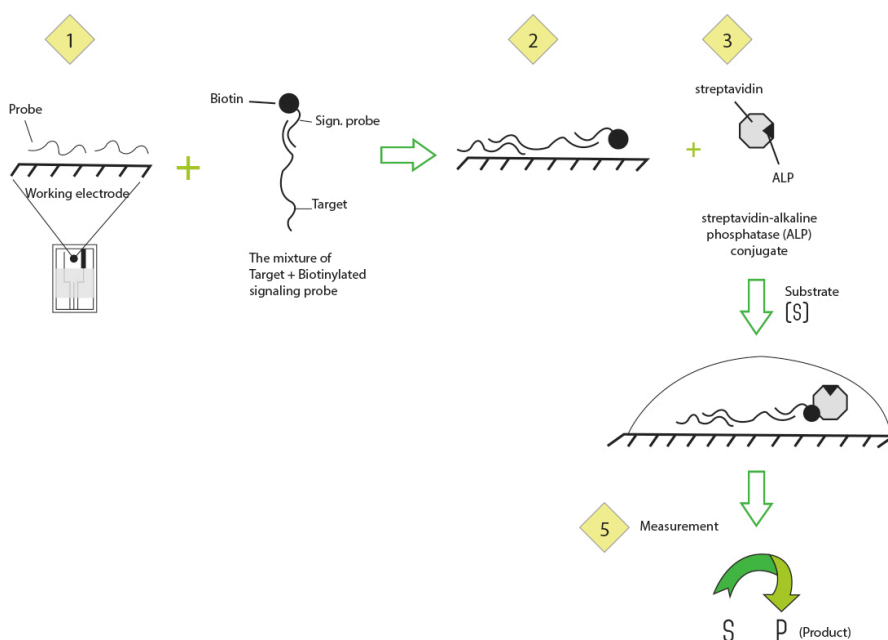


Figura 6. Representación de una hibridación tipo sándwich: 1) Inmovilización de la sonda por adsorción. 2) Hibridación. 3) Interacción con estreptavidina-fosfatasa alcalina. 4) Incubación con α -naftol fosfato. 5) Medición electroquímica usando voltametría de pulso diferencial.

Para el ensayo se utilizaron también controles negativos que se obtuvieron de amplicones de PCR no complementarios con la sonda de captura. El genosensor fue capaz de distinguir entre las muestras con salmonella y los controles negativos.

El genosensor desarrollado es fácil de usar, barato y rápido en la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas. Además, el formato tipo sándwich aportó selectividad y sensibilidad al ensayo.

DISCUSIÓN

La literatura actual en el campo de los genosensores electroquímicos es abundante y apoya el hecho de que estos dispositivos han demostrado ser selectivos, eficaces y rápidos, además de no suponer un alto coste respecto a los métodos tradicionales, que consisten principalmente en la identificación microbiológica y bioquímica específica y requieren aproximadamente de una semana hasta la obtención de resultados

Generalmente se usa la amplificación por PCR en los ensayos con genosensores, y esta combinación resulta más efectiva que la PCR a tiempo real, debido a su mayor sensibilidad además de su simplicidad y bajo coste

En los tres casos estudiados se efectuó una hibridación tipo sándwich tras la amplificación previa del ADN diana del patógeno. Para el caso de *Vibrio* se utilizó peroxidasa de rábano como marcador electroquímico; para el virus del dengue se emplearon liposomas con marcadores fluorescentes y su detección posterior se realizó con un reflectómetro o con microscopía de fluorescencia. En el caso de *Salmonella* se acopló el híbrido a un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina expuesta a una disolución de α -naftol fosfato. En todos ellos se consiguió una detección del patógeno de una manera rápida efectiva, fiable y a bajo coste, en comparación con otras técnicas clásicas de análisis.

CONCLUSIONES

Tras la revisión bibliográfica se ha podido realizar una evaluación del diseño, funcionamiento y aplicabilidad de estos dispositivos, confirmando su relevancia frente a técnicas tradicionales. Los tres estudios revisados (*Vibrio cholerae*, virus del dengue y *Salmonella spp*) concluyen en una detección satisfactoria y rápida de los patógenos causantes de la enfermedad alimentaria.

REFERENCIAS

- ¹ OPS/OMS. “El Salvador, perfil del sistema de servicios de salud.”, Programa de organización y gestión de servicios de salud, Div. de Desarrollo de Sistemas y Servicios de Salud. Junio 2001. Serie: Aportes para la Reforma del Sector Salud en El Salvador.
- ² OPS/OMS. “Vigilancia y prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos.”Subcomité de Planificación y Programación del Comité Ejecutivo. 29ª sesión, 1 y 2 de diciembre, 1997.
- ³ DEL GIALLO, M. L., OZKAN ARIKSOYAL, D., MARRAZZA, G., MASCINI, M., OZSOZ, M.: “Disposable electrochemical enzyme-amplified genosensor for *Salmonella* Bacteria Detection”. *Anal. Lett.*, 2005. 38, 2509-2523.
- ⁴ International Organization for Standardization, ISO 11731, 1998. Water quality part 4: Microbiological methods. Section 4.12: Detection and Enumeration of *Legionella*
- ⁵ REISCHL, U.; LINDE, H. J.; LEHN, N.; LANDT, O.; BARRATT, K.; WELLINGHAUSEN, N. J.: “Direct Detection and Differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in Clinical Specimens by Dual-Color Real-Time PCR and Melting Curve Analysis”. *Clin. Microbiol.* 2002, 40, 3814-3817.
- ⁶ WELTI, M.; JATON, K.; ALTWEGG, M.; SAHLI, R.; WENGER, A.; BILLE, J.: “Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions.” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 45, 85-95.
- ⁷ YÁÑEZ, M. A.; CARRASCO-SERRANO, C.; BARBERA, V. M.; CATALAN, V.: “Quantitative Detection of *Legionella pneumophila* in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of the dotA Gene”. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 3433-3441

- ⁸ PIVIDORI, M. I.: *Nuevos genosensores amperométricos: diseño y construcción*. 2002, p.53
- ⁹ MIRANDA CASTRO, R.: *Sensores electroquímicos de ADN para la detección de Legionella pneumophila*. 2009, p.19-20.
- ¹⁰ BERTI, F., PALCHETTI, I., MASCINI, M., CAO VAZQUEZ, R., VILLALONGA SANTANA, R., CAMACHO CAMPOS, C.: “Inmovilización supramolecular de una cadena oligonucleotídica sobre un electrodo de oro” *Revista cubana de química*, 2007. vol XXIII, 80-87.
- ¹¹ PIVIDORI, M.: *Nuevos genosensores amperométricos: diseño y construcción*. 2002, p.58
- ¹² MIRANDA CASTRO, R.: *Sensores electroquímicos de ADN para la detección de Legionella pneumophila*. 2009, p.33.
- ¹³ MIRANDA CASTRO, R.: *Sensores electroquímicos de ADN para la detección de Legionella pneumophila*. 2009, p.42
- ¹⁴ PUERTA SUAREZ, A.: *Desarrollo de un genoensayo electroquímico para la detección de Salmonella*. 2012, p. 16-17
- ¹⁵ MIRANDA CASTRO, R., DE LOS SANTOS ÁLVAREZ, P., LOBO CASTAÑÓN, M. J., MIRANDA ORDIERES, A., TUÑÓN BLANCO, P.: “Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of *Legionella pneumophila*”. *Anal. Chem*, 2007.79, 4050-4055.
- ¹⁶ LOW, K-F., CHUENRANGSIKUL, K., RIJIRAVANICH, P., SURAREUNGCHAI, W., CHAN, Y-Y.: “Electrochemical genosensor for specific detection of the food-borne pathogen, *Vibrio cholerae*”. *World J. Microb.Biot.*, 2012. 28, 1699-1706.
- ¹⁷ TAHA DARWISH N., BINTI ALIAS Y., MEI KHOR S. “An introduction to dengue-disease diagnostics” *Elsevier*, 2015. 67. 45-55

¹⁸ DEL GIALLO, M. L., OZKAN ARIKSOYAL, D., MARRAZZA, G., MASCINI, M., OZSOZ, M.: “Disposable electrochemical enzyme-amplified genosensor for *Salmonella* Bacteria Detection”. *Anal.Lett*, 2005.38, 2509-2523